

基于 ISSR 分子标记的野生山莨菪遗传多样性研究

张 盾^{1,2}, 任梦云², 张银东^{2*}, 关 潇^{1*}

1. 中国环境科学研究院, 北京 100012

2. 海南大学热带农林学院, 海口 570228

摘要: 目的 通过对甘肃、青海山莨菪 *Anisodus tanguticus* 遗传多样性研究, 为野生山莨菪资源的保护提供依据。方法 采用 ISSR 分子标记技术, 对 11 个野生山莨菪居群的 127 份 DNA 进行扩增, 对其扩增条带进行遗传多样性分析, 在所得遗传距离的基础上进行 UPGMA 聚类分析和 Mantel 检验地理距离, 对野生山莨菪居群间遗传多样性差异进行分析。结果 10 条 ISSR 引物共检测到 131 个条带, 每条引物 11~15 个, 平均 13.1 个, 共 858 个多态性位点; 居群平均多态性位点百分率 (PPB) 59.54%; Nei's 遗传多样性指数 (H) 为 0.220 4, Shannon 信息指数 (I) 为 0.325 4; 遗传距离变化范围 0.073 3~0.306 2; Mantel 检验 $P=0.002$ 。结论 11 个野生山莨菪居群间具有较高的遗传多样性, 各居群间遗传距离与地理距离显著相关, 甘肃、青海山莨菪居群间存在较高多态性, 物种遗传多样性较为丰富, 对野生山莨菪资源的保护与可持续利用提供了参考。

关键词: 山莨菪; ISSR 分子标记; 遗传多样性; 聚类分析; 地理距离

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)01-0219-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.030

Genetic diversity research on *Anisodus tanguticus* based on ISSR molecular markers

ZHANG Dun^{1,2}, REN Meng-yun², ZHANG Yin-dong², GUAN Xiao¹

1. Chinese Research Academy of Environmental Science, Beijing 100012, China

2. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: Objective In order to provide some information for the domestication and protection of wild *Anisodus tanguticus*, therefore to analyze the genetic polymorphism and the relationship of *A. tanguticus* from Gansu and Qinghai province in China.

Methods The amplifying products from 127 DNA based on ISSR makers technique were used to analyze the genetic diversity of 11 populations of wild *A. tanguticus*. The clustering analysis of the unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) and making Mantel test on geographic distance were carried out on the basis of genetic distance obtained, then a dendrogram was constructed. **Results** Total 131 alleles were amplified by using 10 ISSR primers. The number of alleles in per primer range was 11—15 with an average of 13.1, and 858 polymorphic loci were got finally. The average percentage of polymorphic loci (PPB) was 59.54%. The Nei's gene diversity (H) and Shannon's information index (I) were 0.220 4 and 0.325 4 respectively. The genetic distances range was 0.073 3—0.306 2, and Mantel test $P = 0.002$. **Conclusion** The genetic polymorphism among 11 populations of *A. tanguticus* is relatively abundant and there is a directly relationship between genetic distance and geographical distribution among them. There is a high polymorphism among *A. tanguticus* populations between Gansu and Qinghai and the plentiful genetic diversity of species can provide a reference for the protection and sustainable utilizing of wild *A. tanguticus* resources.

Key words: *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher; ISSR molecular markers; genetic diversity; cluster analysis; geographic distance

山莨菪 *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher 为茄科 (Solanaceae)、山莨菪属 *Anisodus* Link et Otto 多年生宿根草本, 别名樟柳参、藏茄、樟柳 (青海)、唐冲那保 (藏语译音)、唐冲稿乌 (四川), 是我国较常用藏药之一^[1], 在藏药上常以种子及根入药,

被《中国生物多样性红色名录》收录, 在中国《国家重点保护野生植物名录》被列为国家 II 级保护植物^[2], 是具有生物多样性国际意义的保护物种。山莨菪含有多种生物碱, 主要供制药厂作为制药原料^[3]。近年来随着世界对中药的认可, 中药生产的工业化,

收稿日期: 2017-09-08

基金项目: 生物多样性保护专项 (2096001006)

作者简介: 张 盾 (1991—) 男, 在读硕士, 研究方向为植物细胞与分子生物学。E-mail: zhangdun107@163.com

*通信作者 关 潇 (1978—) 女, 副研究员, 博士, 研究方向为遗传资源与生物安全。E-mail: cyntia815@126.com

张银东 (1965—) 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为分子生物学。E-mail: 23300558@163.com

中药材的需求量日益增加,从而导致了过量开采,造成了中药资源生态环境的破坏。根据中国已签署的《生物多样性公约遗传资源获取与惠益分享的名古屋议定书》,进一步加强遗传资源动态调查和监测,特别是掌握遗传野生药用植物资源愈发重要^[4]。目前关于山萇蓉的研究主要集中于化学成分、人工栽培相关研究等方面,在分子生物学方面的研究相对较少^[5-6]。

随着中药资源开发与可持续利用的深入研究,更多的研究者应用不同的分子标记技术对中国药用植物进行 DNA 分子水平的鉴定^[7]。ISSR 与其他分子标记如 SSR、RAPD、RFLP 等相比,具有操作简单,无需测序及引物设计,所需 DNA 模板量少,实验成本低,并具有更高的稳定性与重复性等特点^[8-11],在药用植物的鉴定、近缘物种进化关系、中药质量标准化和辅助育种等领域有广泛的应用,ISSR 标记免去了测序和引物设计,具有普遍适用性,同时还具

高多态性,稳定性和可重复性强,因此非常适于种间和种下关系的分析,被广泛应用于物种亲缘关系和遗传多样性研究。本研究采用 ISSR 分子标记技术对甘肃和青海野生山萇蓉资源进行了遗传多样性分析,旨在从分子水平上揭示不同地区野生山萇蓉的亲缘关系,对野生山萇蓉资源的保护利用提供参考,并为 ISSR-PCR 等分子技术在山萇蓉等藏药上的进一步应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2015 年 9 月在甘肃省、青海省各样点(表 1)采集野生状态下生长良好的山萇蓉 *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher 叶片,样品经海南大学热带农林学院张银东教授鉴定后,置于存有变色硅胶的密封袋中干燥保存,每个样点采集大于 10 个样本,每样本个体间距不小于 25 m。一部分叶片样品和根部样品自然阴干,粉碎后放置于 4 °C 冰箱保藏。

表 1 山萇蓉居群采样点及地理特征

Table 1 Sampling points and geographical features of wild *A. tanguticus*

居群编号	居群来源	样本数	纬度	经度	海拔/m	样本编号
1	青海门源县老虎沟	11	37°58.146'N	100°56.029'E	3 182	1~11
2	青海共和县黑马河乡	10	36°52.316'N	99°40.348'E	3 212	12~21
3	甘肃天祝县天堂寺乡	13	36°57.480'N	102°34.053'E	2 494	22~34
4	青海北山互助国家森林公园	11	37°01.488'N	102°24.774'E	2 590	35~45
5	青海铁卜加草原	11	36°54.205'N	100°59.657'E	3 188	46~56
6	青海湟源县 G315 国道	11	36°45.073'N	101°08.738'E	2 799	57~67
7	甘肃碌曲县城外路边	12	34°35.473'N	102°28.329'E	3 128	68~79
8	甘肃卓尼县车巴沟	10	34°24.930'N	102°59.794'E	3 102	80~89
9	甘肃合作市西山头	14	34°58.577'N	102°53.971'E	2 946	90~103
10	甘肃碌曲县阿万仓乡	12	33°54.822'N	101°58.647'E	3 434	104~115
11	甘肃永登县铁成沟	12	36°39.460'N	102°42.789'E	2 295	116~127

1.2 试剂及仪器

EasyPure Plant Genomic DNA Kit(北京全式金生物技术有限公司)用于提取山萇蓉组织 DNA; SMA-4000 超微量分光光度计(美国 merinton 公司)测定准确的 DNA 浓度; ISSR-PCR 反应的 dNTP 购于天根生化科技(北京)有限公司、Taq 酶、Mg²⁺、标准相对分子量 2K Plus II DNA Ladder Marker(全式金)为指示对照;引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)提供的 ISSR 引物序列,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;PCR 反应在 T-professional Standard Gradient 96 梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司)上进行;DDY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂)

上进行凝胶电泳分离 PCR 反应产物;宝如亿核酸染料(Bioroyee Golden View);UVITEC Cambridge 凝胶成像系统进行紫外成像拍照。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取、PCR 扩增与电泳检测

采取改良的 CTAB 法与全式金植物快速提取 DNA 试剂盒相结合方法,提取山萇蓉基因组 DNA,用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,采用微量分光光度计测定 DNA 浓度与纯度,置于-20 °C 保存待用。在 PCR 仪设定扩增程序,首先预变性 94.0 °C、5 min,变性 94.0 °C、30 s,退火 53.5 °C、30 s,延伸 72.0 °C、90 s,共 35 个循环,72.0 °C、7 min,

最后降温 15.0 °C Pause。采用 2.0%琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 反应产物；电极缓冲液为 1×TAE；使用标准相对分子量 2K plus II DNA Ladder marker 作为对照。核酸染料 (Golden View) 进行染色指示，电泳完成后将胶块置于 UV 凝胶成像系统紫外光下成像观察。

2.2 单因素结合正交设计建立 PCR 体系

采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计，对影响 ISSR-PCR 的主要因素，包括 DNA 浓度、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、引物、 Mg^{2+} 浓度进行 5 因素 4 水平的筛选分析，共 16 个处理，每个处理 3 次重复。反应体系中总体积为 25 μ L，包括 10×buffer 2.5 μ L，不足体积用 dd H₂O 补足至 25 μ L。最终筛选出各反应因素的最佳水平，建立山茛菪 ISSR-PCR 反应的最佳体系 (25 μ L) 为 3.0 mmol/L Mg^{2+} ，0.2 mol/L dNTP，0.4 μ mol/L 引物，0.5 U Taq DNA 聚合酶，40 ng DNA，2.5 μ L 10×buffer。

2.3 引物筛选、ISSR-PCR 反应与扩增产物检测

根据建立的山茛菪 ISSR-PCR 反应最佳体系，选择几组山茛菪 DNA 模板，从 100 条 ISSR 引物中筛选出引物，并在梯度 PCR 仪上设置温度梯度筛选引物最适退火温度，采用 1×TAE、2.0%琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 反应产物，使用标准相对分子量 2K plus II DNA Ladder marker 作为对照。核酸染料进行染色指示，电泳结束后将胶块置于 UV 凝胶成像系统紫外光下成像观察，拍照保存。

2.4 数据统计分析

根据电泳结果条带迁移的位置及清晰有无进行统计，将相同迁移位置上稳定出现的条带记为“1”，无带或难分辨的弱带记为“0”，得到“0, 1”原始矩阵。通过 POPGENE 32 软件对供试山茛菪居群 ISSR 结果进行统计分析^[12]，计算多态位点百分率 (PPB)、观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性 (H)、Shannon 信息指数 (I) 和 Nei's 遗传距离 (genetic distance, D)。通过 NTSYS 软件对 Nei's 遗传距离进行 UPGMA (unweight pair-group method with arithmetic average) 聚类分析^[13]。用 NTSYS 软件中的 SIMQUAL 程序计算所有单个样本的遗传相似系数，获得相似系数矩阵，再用其中的 SAHN 程序和 UPGMA 法进行聚类分析，最后通过 Tree-plot 程序生成聚类图。根据 Arcmap 统计的各山茛菪居群位置信息，用 R 语言软件对地理距离与遗传距离进行 Mantel 检验。

3 结果与分析

3.1 ISSR 扩增多态性分析

用筛选出的 10 条引物对 127 份山茛菪材料进行扩增，共扩增出 131 条条带，均具有多态性，平均多态性位点百分率为 99.2%，每个引物扩增出的 DNA 条带数为 11~15 条，这些 DNA 片段大小主要集中在 1 000~5 000 bp(图 1)，平均为 13.1 条(表 2)。扩增条带数最多的为 UBC 889，达 15 条，扩

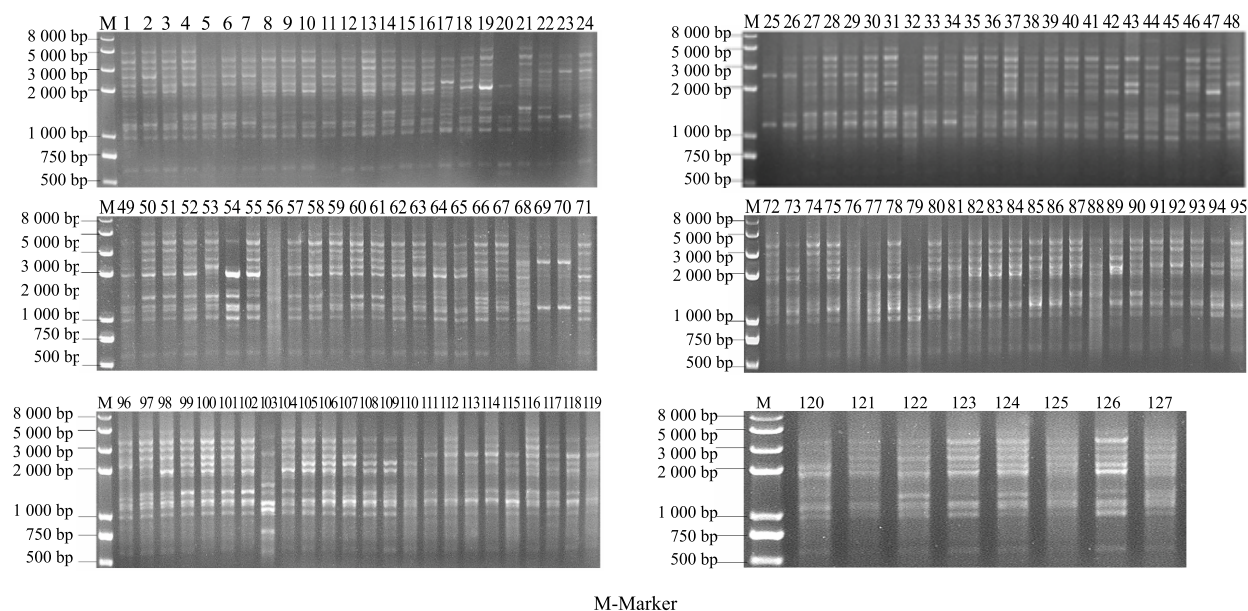


图 1 引物 UBC809 对 127 份野生山茛菪类型总 DNA 的 ISSR 扩增结果

Fig. 1 Amplification results of total DNA based on ISSR Primer UBC809 from 127 types of wild *A. tanguticus*

表 2 ISSR 引物序列及扩增条带数

Table 2 ISSR primers sequences and amplification bands

引物	序列	理论退火温度/°C	退火温度/°C	扩增总带数	多态性条带数	PPB/%
UBC808	(AG) ₈ C	54.6	53.5	13	13	100
UBC809	(AG) ₈ G	54.6	54.5	13	13	100
UBC811	(GA) ₈ C	54.6	53.5	15	14	93.3
UBC826	(AC) ₈ C	54.6	53.5	11	11	100
UBC873	(GAC A) ₄	51.5	55.3	14	14	100
UBC881	(GGG TG) ₃	61.8	60.8	13	13	100
UBC887	DVD (TC) ₇	52.6	50.4	13	13	100
UBC889	DBD (AC) ₇	53.0	51.0	15	15	100
UBC890	VHV (GT) ₇	53.0	53.9	11	11	100
UBC891	HVH (TG) ₇	52.6	54.6	13	13	100
合计	—	—	—	131	130	100
平均数	—	—	—	13.1	13.0	99.2

扩增条带数最少的是 UBC 826 和 UBC 890, 为 11 条。几乎所有引物多态性百分比均为 100%, 仅 1 条引物 UBC811 引物多态性为 99.3%, 表明 ISSR 能够揭示材料间的多态性。

3.2 山茛菪 ISSR 的遗传多样性分析

11 个野对供试山茛菪居群 ISSR 结果进行统计分析 (表 3)。各居群的多态性位点百分率 (PPB) 分别为 48.85%、65.65%、72.52%、55.73%、67.94%、58.02%、70.23%、46.56%、63.36%、48.85%、57.25%。居群 3 甘肃天祝县天堂寺乡的多态位点百分率最高, 居群 8 甘肃卓尼县车巴沟的多态位点百分率最低。从居群水平, 11 个居群的 PPB 为 59.54%; H

在 0.174 2~0.281 5, 平均值为 0.220 4。 I 在 0.256 6~0.411 5, 平均值为 0.325 4。各居群的 I 大小变化与 PPB 正相关。在物种水平上, PPB、期望杂合度、 I 分别为 97.71%、0.3394、0.504。ISSR 分子标记的遗传多样性分析表明野生山茛菪居群存在较高的遗传多样性。

3.3 山茛菪 ISSR 的遗传结构与经纬度和海拔关系

根据 POPGENE 运算得到的结果进行分析, 11 个野生山茛菪居群的总基因多样性 (H_t) 为 0.339 8, 种群内遗传多样性 (H_s) 为 0.220 4, 表明其遗传多样性来自于居群之间。基因分化系数 (G_{st}) 为 0.351 3, 发生在种间的遗传分化为 35.13%, 则剩下 64.87%

表 3 11 个山茛菪居群遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of 11 wild *A. tanguticu* populations

居群	N_a	N_e	H	I	PPB/%
1	1.488 5±0.501 8	1.325 9±0.392 8	0.184 3±0.210 7	0.270 8±0.299 8	48.85
2	1.656 5±0.476 7	1.460 9±0.398 1	0.258 8±0.211 2	0.377 5±0.297 7	65.65
3	1.725 2±0.448 1	1.503 2±0.399 0	0.281 5±0.204 7	0.411 5±0.285 3	72.52
4	1.557 3±0.498 6	1.372 5±0.400 8	0.210 3±0.212 8	0.308 8±0.301 5	55.73
5	1.679 4±0.468 5	1.449 5±0.391 5	0.256 4±0.203 2	0.378 2±0.286 1	67.94
6	1.580 2±0.495 4	1.351 9±0.377 0	0.205 2±0.201 6	0.306 6±0.287 7	58.02
7	1.702 3±0.459 0	1.425 4±0.378 0	0.247 2±0.197 6	0.368 9±0.277 9	70.23
8	1.465 6±0.500 7	1.307 5±0.389 4	0.174 2±0.208 0	0.256 6±0.296 5	46.56
9	1.633 6±0.483 7	1.380 7±0.389 0	0.218 7±0.206 2	0.325 3±0.290 7	63.36
10	1.488 5±0.501 8	1.334 2±0.393 0	0.189 6±0.210 4	0.278 2±0.300 7	48.85
11	1.572 5±0.496 6	1.339 9±0.377 1	0.198 2±0.201 0	0.297 0±0.286 4	57.25
居群水平	1.595 4	1.386 5	0.220 4	0.325 4	59.54
物种水平	1.977 1±0.150 2	1.590 8±0.330 7	0.339 4±0.157 2	0.504 3±0.201 9	97.71

的遗传分化于山茛菪的居群内发生，居群内的遗传分化明显比居群之间的分化要大。种群间的基因流 (N_m) 为 0.923 2，表明居群之间的基因流十分丰富。

对野生山茛菪不同居群采样环境因素中的经纬度，海拔与遗传多样性指标进行 Pearson 相关性检验

(表 4)，相关系数 0.8~1.0 表示极强相关，0.6~0.8 强相关，0.4~0.6 表示中等程度相关，0.2~0.4 弱相关，0.0~0.2 表示极弱相关或无相关。根据表 4， N_a 、 N_e 、 H 、 I 等遗传多样性指标与经纬度、海拔弱相关， r 绝对值为 0.098 7~0.265 4， $P>0.05$ ，山茛菪居群遗传多样性指标与经纬度坐标和海拔的关系不显著。

表 4 多样性指标与经纬度和海拔间的 Pearson 相关性检验

Table 4 Pearson correlation test between genetic index and latitude, longitude, altitude

多样性指标	经度	纬度	海拔
N_a	-0.104 3 (0.760 1)	0.176 6 (0.603 4)	-0.216 1 (0.523 3)
N_e	-0.265 4 (0.430 2)	0.265 0 (0.431 0)	-0.098 7 (0.772 8)
H	-0.251 1 (0.456 5)	0.249 0 (0.460 3)	-0.114 3 (0.738 0)
I	-0.231 7 (0.493 1)	0.238 3 (0.480 4)	-0.131 5 (0.700 0)
PPB	-0.104 3 (0.760 1)	0.176 6 (0.603 4)	-0.216 1 (0.523 3)

3.4 基于 ISSR 分子标记的聚类分析

利用 10 个 ISSR 引物共扩增出 131 条条带，计算山茛菪 11 个居群的 Nei's 遗传距离及遗传相似系数 (表 5)。居群之间的遗传距离变化范围为 0.073 3~0.306 2，平均为 0.172 2。11 份野生山茛菪的相似系数在 0.736 2~0.929 3，平均值为 0.78，说明所选取的山茛菪单株在分子水平上差异较小，其遗传多样性较弱。1 号和 2 号的相似系数最大，为 0.929 3，表明这 2 个单株的亲缘关系最近，遗传相似程度是最高的。实验结果转换“0、1”矩阵数据，转换分析计算遗传相似系数矩阵，对 127 个样本 11 个居群进行 UPGMA 聚类分析 (图 2)，结果表明，在相似系数约 0.84 处，11 个居群分为 A 和 B 2 大类，A 类分了 2 个亚群，I 类群为 1 号青海门源老虎沟居群和 2 号青海黑马河居群，II 类群为 3 号甘肃天祝

县天堂寺居群、5 号青海铁卜加草原居群及 4 号青海北山互助国家森林公园居群；B 类分 3 个亚群，III 类群为 6 号青海湟源县 G315 国道居群和 7 号甘肃碌曲县城外居群，IV 类群为 8 号甘肃卓尼县车巴沟居群和 9 号甘肃合作市西山头居群，V 类群为 10 号甘肃碌曲县阿万仓乡居群和 11 号甘肃永登县铁成沟居群。通过对标记结果进行主坐标分析生成三维图 (图 3)，其分析结果与 UPGMA 聚类分析结果一致。

3.5 遗传分化、遗传距离与地理距离相关性分析

根据 GPS 记录的各野生山茛菪居群经纬度，通过 ArcMap 软件计算出各居群间的地理距离 (表 6)。参照 Burns 等利用 Mantel 相关性检验分析不同种群地理距离的自然对数和遗传距离间的相关性^[14]。使用 R 语言进行 Mantel 检验， $P=0.002$ (图 4)，表

表 5 基于 ISSR 分子标记山茛菪 11 个居群的 Nei's 遗传距离 (左下角) 及遗传相似系数 (右上角)

Table 5 Nei's genetic distance (left corner) and genetic similar coefficient (right corner) of 11 wild *A. tanguticus* populations based on ISSR molecular markers

居群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	****	0.929 3	0.861 1	0.852 8	0.832 1	0.808 0	0.799 0	0.750 7	0.781 1	0.739 1	0.792 4
2	0.073 3	****	0.899 0	0.864 4	0.833 9	0.837 0	0.831 3	0.778 5	0.793 0	0.736 2	0.774 8
3	0.149 6	0.106 5	****	0.890 8	0.903 2	0.829 4	0.874 3	0.796 9	0.816 8	0.812 2	0.824 7
4	0.159 2	0.145 7	0.115 6	****	0.893 7	0.835 3	0.861 1	0.830 2	0.842 9	0.808 3	0.851 0
5	0.183 9	0.181 6	0.101 8	0.112 4	****	0.886 3	0.895 3	0.850 3	0.854 8	0.859 4	0.882 0
6	0.213 2	0.177 9	0.187 0	0.180 0	0.120 7	****	0.907 8	0.857 4	0.866 9	0.810 0	0.816 0
7	0.224 4	0.184 8	0.134 3	0.149 6	0.110 6	0.096 7	****	0.888 5	0.893 8	0.842 8	0.853 0
8	0.286 8	0.250 4	0.227 0	0.186 1	0.162 2	0.153 8	0.118 2	****	0.895 9	0.862 2	0.871 6
9	0.247 0	0.232 0	0.202 3	0.171 0	0.156 9	0.142 9	0.112 2	0.110 0	****	0.876 9	0.829 3
10	0.302 3	0.306 2	0.208 0	0.212 8	0.151 5	0.210 7	0.171 0	0.148 3	0.131 3	****	0.900 9
11	0.232 7	0.255 1	0.192 7	0.161 3	0.125 6	0.203 4	0.159 0	0.137 4	0.187 1	0.104 3	****

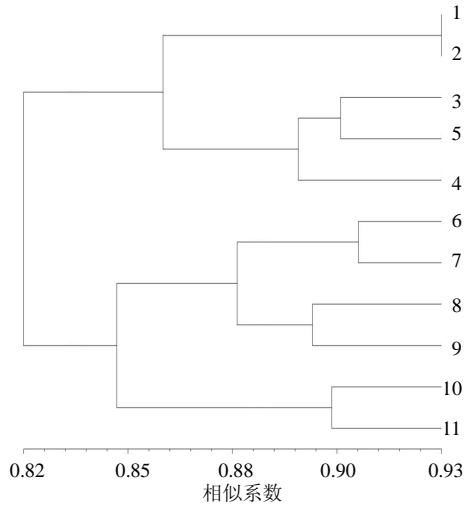


图 2 基于 ISSR 标记山萮蓉 11 个居群聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrograms of genetic relationships among 11 *A. tanguticus* based on ISSR markers

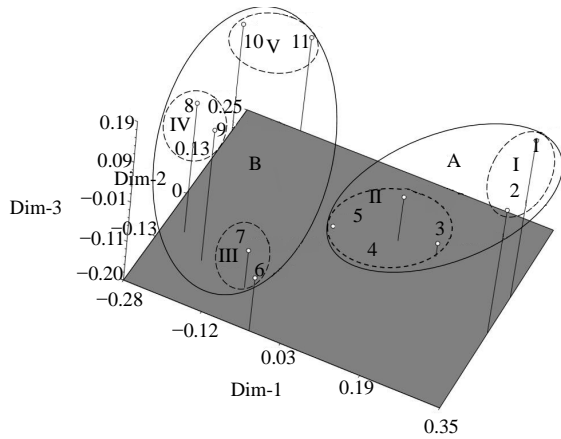


图 3 基于 ISSR 数据获得的 11 个野生山萮蓉居群地主坐标三维图
Fig. 3 Three-dimensional figure of first three main coordinates based on ISSR data obtained from 11 species of wild *A. tanguticus* populations

表 6 山萮蓉 11 个野生居群间地理距离 (左下角) 及其地理距离的自然对数 (右上角)

Table 6 Geographical distance (Km) (left corner) and the natural logarithm of geographical distance t (right corner) among 11 wild *A. tanguticus* populations

居群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	****	5.107 2	5.209 4	5.121 6	4.774 0	4.916 0	5.990 2	6.077 1	5.929 4	6.130 6	5.368 8
2	165.206 3	****	5.553 5	5.499 9	4.769 7	4.883 8	5.880 5	6.006 5	5.883 9	5.964 3	5.607 7
3	182.978 0	258.149 7	****	2.749 6	4.943 7	4.858 8	5.571 2	5.651 6	5.402 3	5.834 8	3.577 2
4	167.599 9	244.675 6	15.636 3	****	4.844 6	4.762 0	5.598 7	5.684 6	5.444 6	5.850 6	3.886 8
5	118.396 8	117.880 8	140.295 3	127.047 7	****	3.073 8	5.667 4	5.799 8	5.614 4	5.839 2	5.048 8
6	136.462 3	132.131 4	128.866 1	116.974 5	21.623 9	****	5.591 2	5.732 4	5.532 3	5.780 0	4.944 8
7	399.475 1	357.998 2	262.747 7	270.072 5	289.273 8	268.058 1	****	3.950 4	4.059 1	4.476 1	5.439 4
8	435.750 1	406.044 9	284.758 0	294.287 2	330.236 9	308.694 1	51.955 6	****	4.140 6	4.693 3	5.521 8
9	375.913 9	359.215 0	221.917 1	231.496 1	274.353 1	252.730 8	57.921 2	62.842 8	****	4.977 9	5.232 8
10	459.716 5	389.289 7	341.982 2	347.428 3	343.507 9	323.765 0	87.889 4	109.216 5	145.168 9	****	5.742 0
11	214.613 2	272.515 2	35.772 1	48.756 3	155.840 2	140.448 1	230.313 8	250.093 3	187.317 5	311.698 1	****

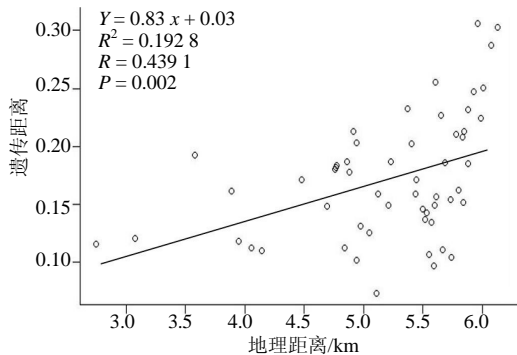


图 4 地理距离自然对数和遗传距离 Mantel 检验
Fig. 4 Mantel test between geographical distance and genetic distance

明不同山萮蓉居群的遗传距离与地理距离显著地相关。

4 讨论

遗传多样性是生物多样性的基础，是重要的生物资源，所有的遗传多样性都是发生在分子水平，遗传变异的产生，形成了丰富的遗传多样性^[15-17]。PPB 是衡量物种遗传变异水平高低的一个重要指标，是度量遗传多样性的重要参数^[18]。本研究通过筛选出 10 条 ISSR 引物对野生山萮蓉 11 个居群共 127 份样本进行 PCR 扩增，共产生了 131 条扩增带，其中有 130 条具有多态性，127 份野生山萮蓉多态性位点平均比率为 92.46%。物种的地理分布范围往

往是决定植物物种遗传多样性的主要因素之一，自然分布范围广的物种通常趋向于具有更高的遗传多样性，反之则具有相对较低的遗传多样性^[19]。通过生物学软件对 11 个野生山莨菪居群的遗传多样性进行分析，遗传多样性指数 (PPB、*H*、*I*) 综合显示甘肃和青海的山莨菪具有丰富的遗传多样性。再分析标记产生的矩阵，当一个种群分类地位用其他方法难以解决时，使用遗传相似系数信息，对 11 个居群分子标记数据进行分析得出遗传相似系数在 0.62~0.95，根据聚类图可看出居群的亲缘远近。从分子水平上来说，遗传距离的变幅越大，PPB、*H* 和 *I* 越高，遗传多样性水平越高，同时也说明该物种的遗传背景越复杂^[20]。

我国国土辽阔，物产极为丰富，特别是药用植物遗传资源。武建勇等^[21]通过对 26 种原产中国的常用药用植物在国内外各专利局进行检索，发现有 23 种植物被国外机构或者个人申请了 158 个专利，所有权分属 17 个国家的公司或个人，其中美、日、韩为主要的专利拥有国，药用植物遗传资源的流失与研究的落后对我国中药研究带来了巨大的损失。运用生理生化研究与分子生物学技术相结合来研究山莨菪等野生药用植物资源，掌握濒危植物野生资源动态，进行遗传分析及鉴定，从种群基因层面制定出野生植物资源的保护性利用措施有相当重要的意义。山莨菪作为我国特有的珍稀药用植物，同时也是野生资源相对稀少的藏药资源，生存受到人类活动的剧烈破坏，野生资源的收集有一定的难度，并且其生境复杂，雨水的冲刷等环境因素对其传粉授精影响较大，致使遗传资源减少^[22]，同时其药性成分也受环境影响较大^[23]，国内有关于山莨菪研究绝大部分集中于山莨菪碱的临床实践。特别是随着 2016 年我国正式成为《〈生物多样性公约〉关于获取遗传资源和公正公平分享其利用所产生惠益的名古屋议定书》缔约方，这标志着我国生物产业进入惠益共享时代，生物遗传资源监管工作将迈入日趋规范化的法治轨道。了解物种的遗传结构是进行物种保护最重要的一环，对于制定科学的保护和物种恢复策略起着极为重要的作用^[24]。

对于甘肃、青海地区的 11 个野生山莨菪居群，各遗传指数显示均拥有较高的遗传多样性。聚类分析和主成分分析结果均显示甘肃和青海的山莨菪居群在聚类图上相互交错分布，A 类种 II 类群为 3 号甘肃天祝县天堂寺居群，5 号青海铁卜加草原居群

及 4 号青海北山互助国家森林公园居群，B 类种 III 类群 6 号青海湟源县 G315 国道居群和 7 号甘肃碌曲县城外居群，但从地理学角度来看，聚类在一起的居群的地理位置相对较近，其遗传关系相似程度与其地理分布的远近有明显的关系，Mantel 检验也证明了这个结论，海拔与遗传多样性的关系不显著，可能是由于其生存环境海拔属于高原地带，高度差异在其演化过程中造成的分化影响早已不明显。采取就地保护策略，保障其原始居群的遗传多样性，同时采用不同地区山莨菪种质资源进行迁地保护，突破地理隔离（包括河流、山脉及人为的公路和沟渠等）阻碍居群间基因交流的因素，保证基因的流动。后续对于野生山莨菪资源的研究，可采用更多样的分子标记技术，或者通过高通量测序获得全基因组信息来设计诸如 SSR、SNP 等引物序列，扩大山莨菪野生遗传资源的采集范围，对我国野生山莨菪居群的遗传资源进一步深入研究。

参考文献

- [1] 杨永昌. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [2] 匡可任, 路安民. 中国植物志 (茄科) [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [3] 徐靖, 李俊生, 薛达元, 等. 《遗传资源获取与惠益分享的名古屋议定书》核心内容解读及其生效预测 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 720-725.
- [4] 蒋运斌, 苟琰, 袁茂华, 等. 山莨菪根 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2015, 38(5): 957-961.
- [5] 许璟瑛, 周国英, 陈桂琛. 青海栽培山莨菪重金属元素特征 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49(5): 1143-1145.
- [6] 段元文, 张挺峰, 刘建全. 山莨菪 (茄科) 的传粉生物学 [J]. 生物多样性, 2007, 15(6): 584-591.
- [7] 任梦云, 陈彦君, 张盾, 等. ISSR 标记技术在药用植物资源中的研究进展及应用 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(4): 63-69.
- [8] Gupta M, Chyi Y S, Romero-Severson J, et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats [J]. *Theor Appl Gene*, 1994, 89(7/8): 998-1006.
- [9] 王笠, 赵志礼, 倪梁红, 等. 基于 ISSR 标记的麻花苋遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3168-3174.
- [10] McGregor C E, Lambert C A, Greyling M M, et al. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm [J]. *Euphytica*, 2000, 113(2): 135-144.
- [11] Wolff K, Zietkiewicz E, Hofstra H. Identification of

- chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91(3): 439-447.
- [12] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, *et al*. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [J]. *Mol Biol Biot Centre*, 1997, 10: 295-301.
- [13] Rohlf F J. NTSYS-pc: *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System System Version 2.1* [M]. New York: Applied Biostatistics, 2000.
- [14] Burns E L, Eldridge M D, Houlden B A. Microsatellite variation and population structure in a declining Australian Hyloid *Litoria aurea* [J]. *Mol Ecol*, 2004, 13(7): 1745-1757.
- [15] 时圣明, 潘明佳, 王 洁, 等. 分子鉴定技术在中药中的应用 [J]. *中草药*, 2016, 47(17): 3121-3126.
- [16] 马克平. 试论生物多样性的概念 [J]. *生物多样性*, 1993, 1(1): 20-22.
- [17] 徐 雯, 瞿印权, 张玲玲, 等. 基于 RAPD 的福建产南方红豆杉遗传多样性研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(14): 2943-2949.
- [18] 王 蕾, 叶志云, 蒋 焱, 等. 利用 ISSR 技术对优质红锥种质资源遗传多样性的分析 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2006, 45(S1): 91-94.
- [19] 王祎玲, 赵桂仿. 七筋菇自然居群的遗传结构分析 [J]. *云南植物研究*, 2007, 29(3): 293-299.
- [20] 张 炜, 罗建勋, 辜云杰, 等. 西南地区麻疯树天然种群遗传多样性的等位酶变异 [J]. *植物生态学报*, 2011, 35(3): 330-336.
- [21] 武建勇, 薛达元, 赵富伟, 等. 从植物遗传资源透视《名古屋议定书》对中国的影响 [J]. *生物多样性*, 2013, 21(6): 758-764.
- [22] 雷菊芳, 李富银, 扎西顿珠, 等. 青藏高原藏药用植物生长特性及藏药资源保护初探 [J]. *世界科学技术*, 2002, 4(2): 60-64.
- [23] Wang Y, Meng L H, Yang Y P, *et al*. Change in floral orientation in *Anisodus luridus* (Solanaceae) protects pollen grains and facilitates development of fertilized ovules [J]. *Ameri J Bot*, 2010, 10(97): 1618-1624.
- [24] 肖 猛, 李 群, 郭 亮, 等. 四川西部濒危植物桃儿七遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *生态学报*, 2015, 35(5): 1488-1495.